

Thesis

MUNICH

1964

34

Untersuchungen über die Natur
des hitzestabilen Inhibitors der
Rheumafaktor-Agglutinationsreaktion

von

HERBERT FAHR

München 1964

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen über die Natur des hitzestabilen Inhibitors
der Rheumafaktor-Agglutinationsreaktion

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert Fahr

München

1964

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1964

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Problematik	5
Eigene Untersuchungen	8
Methodik	8
Versuchsreihe I	9
Versuchsreihe II	17
Versuchsreihe III	20
Diskussion	23
Zusammenfassung	25
Literaturverzeichnis	26



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Problematik

Es ist bereits seit dem Jahre 1954 (H e l l e r u. Mitarb.⁸) bekannt, daß im Serum gesunder Versuchspersonen ein hitzestabiler Inhibitor bestehen muß, da inaktivierte Seren Gesunder die Häm-agglutinationsreaktionen des Rheumatikerserums hemmen. Dieser hitzestabile Inhibitor schien in der Cohn-Fraktion II des Serums lokalisiert zu sein⁸ und fand sich außerdem sowohl in der Euglobulinfraktion als auch in deren Überstand¹⁶, Z i f f und Mitarbeiter¹⁶ glaubten schließlich, daß auch in Rheumatikerseren, jedoch nur im Überstand der Euglobulinfraktion, der hitzestabile Inhibitor vorhanden sei, während in der Euglobulinfraktion vorwiegend die agglutinierende Fähigkeit lokalisiert sei. Auf dieser Beobachtung beruhte der von Z i f f und Mitarbeitern¹⁶ inaugurierte Inhibitionstest. In diesem Test, in dem die Euglobulinfraktion eines inaktivierten Serums einem bekannt positiven Rheumatikerserum (Referenzserum) zugegeben und im Hämagglutinationstest untersucht wird, inhibieren Rheumatikerseren das Referenzserum nicht in gleichem Ausmaß wie die Seren Gesunder, auch dann nicht, wenn sie im einfachen Agglutinationstest negativ sind. Modifikationen dieses Inhibitionstestes wurden von M i e h l k e und P u t t n i n s¹² überprüft und von S c h i e r z¹⁵ modifiziert sowie von H a l l und Mitarbeitern⁷ und M a t h i e s und F l a d e r e r¹¹ als Modifikation mit dem Latexfixationstest bzw. Latextropfentest durchgeführt.

Nach den umfangreichen Untersuchungen von C h r i s t i a n², E d e l m a n n und Mitarbeitern⁴, D e i c h e r³ sowie M a t h i e s¹⁰ ist nur aggregiertes γ -Globulin in der Lage, eine inhibitorische Wirkung auf die Agglutinationsaktivität des Rheumafaktors auszuüben. M a t h i e s¹⁰ sprach die Vermutung aus, daß der sog. hitzelabile Inhibitor im eigentlichen Sinne gar nicht existiert, sondern bei der Serumaktivierung durch die

Erhitzung des Serums auf 56°C erst entsteht. Er konnte zeigen, daß bei Verwendung nicht inaktivierter Seren der schon von R a n t z und Mitarbeitern¹⁴ und D e i c h e r³ ausführlich untersuchte hitzelabile Inhibitor wirksam ist, der grundsätzlich anders reagiert, indem er sich sowohl an Rheumafaktor als auch an die beladenen Latexpartikel anlagert und dort Stellen besetzt, die dann die Reaktion zwischen Rheumafaktor und beladenen Latexpartikeln nicht mehr ermöglichen.

Der "hitzestabile Inhibitor" reagiert im Prinzip wie die auf der Latexoberfläche aggregierten γ -Globulin-Moleküle, indem er eine Bindung mit Rheumafaktor eingeht. Diese Reaktion ist allerdings nicht sichtbar, da sie keine Agglutination von Träger-substanz, wie sie die Latexpartikel darstellen, als Indikator bewirken kann. Die Reaktion von Rheumafaktor mit "hitzestabilem Inhibitor" ist aber prinzipiell die gleiche, wie sie im Präzipitintest nach E p s t e i n und Mitarbeitern⁵ bzw. in der Grenzschnittreaktion nach K l e i n e und Mitarbeitern⁹ und M ü l l e r und Mitarbeitern¹³ vorliegt. Im ersteren Fall dient der Stickstoffgehalt des Präzipitates als Meßgröße, während im zweiten Fall die Strahlenablenkung durch die Präzipitation an der Grenzschnitt zwischen γ -Globulin (erhitzte Cohn-Fraktion II) und Rheumatiker Serum bestimmt wird. Man hat sich die Wirkung des "hitzestabilen Inhibitors" so vorzustellen, daß er durch seine Reaktion mit Rheumafaktor diesen von der Reaktion mit den beladenen Latexpartikeln zum Teil abstrahiert. Im Inhibitions-test mit in der Agglutinationsreaktion negativen Rheumatiker-Seren gehen die geringen Rheumafaktormengen eine Reaktion mit γ -Globulin-Aggregaten ein, wodurch letztere dann in verminderter Menge als Inhibitor der Referenzserum-Reaktion zur Verfügung stehen. Damit lassen sich geringe Rheumafaktor-Aktivitäten nachweisen, die im Agglutinationstest noch keine positive Reaktion ergeben.

Es bereitet naturgemäß Schwierigkeiten, den Gehalt nativen Serums an etwaigem hitzestabilen Inhibitor zu untersuchen, da bei Inaktivierung des hitzelabilen Inhibitors gleichzeitig "hitzestabiler Inhibitor" durch Bildung von γ -Globulin-Aggregaten entsteht.

Nur wenn es gelänge, den hitzelabilen Inhibitor zu inaktivieren, ohne die Aggregatbildung von γ -Globulin nachweislich oder vermutlich zu fördern, ließen sich Aussagen über den Gehalt des nativen Serums an etwaigen inhibitorischen Potenzialen eines hitzestabilen Faktors machen. Wenn Deicher³ bei elektrophoretischer Serumauftrennung im $\gamma_1(-\beta_2)$ -Globulinbereich einen hitzestabilen Inhibitor gefunden hat, dessen inhibitorische Potenz sich durch Erhitzen des Serums für 30 min auf 56°C wesentlich verstärkte, so ist die Frage, ob es sich hier nicht auch bereits um Aggregate handelte, die bei der Elektrophorese entstanden. Es ist verständlich, daß diese elektrophoretisch eine etwas abweichende Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber einem γ_2 -Globulin-Inhibitor aufweisen, der erst nach Erhitzen wirksam wird, also anscheinend nach der Elektrophorese noch nicht im Aggregatzustand vorlag. Nach den Untersuchungen Deicher's³ ist übrigens der "hitzelabile Inhibitor" individuell in seiner inhibitorischen Potenz sehr unterschiedlich, zumindest soll die Aggregationsfähigkeit der 7S- γ -Globuline individuell sehr schwanken können.

Es war Aufgabe dieser Arbeit, weitere Anhaltspunkte dafür zu liefern, daß der "hitzestabile Inhibitor" durch Aggregation von 7S- γ -Globulinen entsteht. Es wurden Versuchsanordnungen gewählt, mit denen eine Aussage bezüglich der Bedeutung des Aggregationszustandes erlaubt ist.

Eigene Untersuchungen

Methodik

Es wurden in den Untersuchungen eine von Mathies¹⁰ nach Bernhard¹ modifizierte Methode eines Latex-Fixationstestes angewandt, die auf der photometrischen Messung der optischen Dichte des Überstandes nach Abzentrifugierung der agglutinierten Latexpartikel nach Reaktion des Rheumafaktors mit dem an der Latexoberfläche aggregierten γ -Globulin beruht.

Es wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des Rheumatikerserums (Referenzserum) mit Pufferlösung (handelsübliche Glykokoll-NaCl-Pufferlösung der Behring-Werke), beginnend bei 1:20, hergestellt. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml einer mit der gleichen Pufferlösung auf 1:50 verdünnten Latexsuspension (handelsübliche Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latexpartikel der Behring-Werke) gegeben. Nach Durchmischung erfolgte Inkubation für 60 min bei 56°C.

Die Röhrchen wurden anschließend 5 min bei 2400 U/min zentrifugiert. Dann wurde der Bodensatz durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und schließlich nochmals 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der dann jeweils die nicht agglutinierten Latexpartikel enthält, wurde einer photometrischen Dichtemessung mit dem Eppendorf-Photometer, Filter 578 nm, unterzogen. Je mehr beladene Latexpartikel durch Reaktion mit Rheumafaktor agglutiniert sind, desto geringer ist die optische Dichte des Überstandes, die in % angegeben wird. Als Bezugswert wird dabei die 100%ige optische Dichte zugrunde gelegt. Dieser 100%-Wert besagt, daß in der jeweiligen Versuchsanordnung keine Latex-Agglutination durch Reaktion mit Rheumafaktor zustande kam und berücksichtigt eine etwaige Spontanagglutination und etwaige Serumtrübungen, die entsprechend zu subtrahieren sind. Nach dem Vorschlag von Mathies¹⁰ ist dieser 100%-Wert am besten dadurch festzulegen, daß man die Verdünnungsreihe so lang verlängert, bis eine Zunahme der optischen Dichte nicht

mehr festgestellt werden kann. Der Mittelwert der drei letzten Verdünnungen, die diese Forderung erfüllen, wird als 100% optische Dichte (O.D.) der Berechnung zu Grunde gelegt.

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Normalseren zum Studium ihrer inhibitorischen Aktivitäten auf die agglutinatorische Fähigkeit eines bekannt positiven Rheumatikerserums (Referenzserum) untersucht. Es war also erforderlich, diese Normalseren (nativ bzw. inaktiviert) zum Agglutinationssystem zuzugeben. Es wurde jeder Referenzserumverdünnung 2 ml einer mit 1:10 konstanten Normalserumverdünnung zugegeben. Bei den Kontrolluntersuchungen ohne Normalserumzugabe wurde dieses durch 2 ml Pufferlösung ersetzt.

Die in den einzelnen Versuchen unterschiedlichen Anordnungen wurden in Form von Formeln dargestellt, die die Reihenfolge der Zugabe und Reaktionen der Reaktionsteilnehmer sowie die Inkubations- und Inaktivierungs-Zeiten und -Temperaturen am übersichtlichsten zeigen. Die in den Formeln eingeführten Symbole bedeuten: R = Rheumatikerserum (Referenzserum), N = Normalserum, L = Latexsuspension. Bei Angabe zweier Inkubations- bzw. Inaktivierungstemperaturen und -zeiten wurde der untere Vorgang im Anschluß an den oberen durchgeführt.

Versuchsreihe I

M a t h i e s ¹⁰ hatte bereits gezeigt, daß der hitzelabile Inhibitor sowohl mit Rheumafaktor als auch mit den beladenen Latexpartikeln reagiert und dort Stellen besetzt, die eine gegenseitige Reaktion von Rheumafaktor mit aggregiertem γ -Globulin dann nicht mehr ermöglichen. Nach Seruminaktivierung verschwindet der hitzelabile Inhibitor und es verbleibt eine inhibitorische Restaktivität, die dem hitzestabilen Inhibitor zugeschrieben wird. M a t h i e s ¹⁰ konnte in Übereinstimmung mit der Auffassung anderer Autoren wahrscheinlich machen, daß der hitzestabile Inhibitor nicht eigentlich als solcher anzusehen ist, sondern erst durch Aggregatbildung von γ -Globulin bei der Seruminaktivierung entsteht. Es handelt sich dann um eine Reaktion

des Rheumafaktors mit γ -Globulin-Aggregaten, so daß der Rheumafaktor zum Teil von der Reaktion mit den beladenen Latexpartikeln abstrahiert wird. Das würde bedeuten, daß im nativen Normalserum allein hitzelabiler Inhibitor, dagegen im inaktivierten Serum allein "hitzestabiler Inhibitor" vorhanden ist. Jedoch ist noch nicht bewiesen, daß sich im nativem Serum auch eine inhibitorische Aktivität findet, die bei Seruminaktivierung erhalten bleibt und nicht der Aggregation von vorher nicht inhibitorischem γ -Globulin zuzuschreiben ist. Es sollte deshalb ursprünglich versucht werden, eine Möglichkeit zu finden, um den hitzelabilen Inhibitor zu inaktivieren, ohne durch Erwärmen auf 56°C eine Aggregation von γ -Globulin zu erzielen.

C h r i s t i a n ² erwähnt, daß der hitzelabile Inhibitor durch die Aufbewahrung des Serums im Kühlschrank bei Einfrieren unter wiederholtem Wiederauftauen inaktiviert wird. Wir haben deshalb Inhibitionsuntersuchungen mit Normalseren durchgeführt, die diesen Vorbehandlungen unterworfen wurden. Zum Vergleich dazu wurden die gleichen Untersuchungen mit frischem Serum durchgeführt. Auch wurde inaktiviertes Serum verwandt, bzw. das Gemisch von Normalserum mit Rheumatiker Serum inaktiviert. Diese Versuchsanordnungen erlauben Aussagen über das Verhalten und die Natur der Inhibitoren, die später zu diskutieren sind.

Versuchsanordnung

- 1) (R + L) $60' 56^{\circ}$ (Standard-Agglutination)
- 2) $[(N^{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 60' 56^{\circ}$
- 3) $[(N^{\text{nativ}} + R) \frac{45' 37^{\circ}}{30' 56^{\circ}} + L] 60' 56^{\circ}$
- 4) $[(N^{\text{inakt.}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 60' 56^{\circ}$

Diese Versuchsanordnungen wurden in der Versuchsreihe Ia-c grundsätzlich angewandt. Unterschiede in den einzelnen Versuchsreihen beziehen sich auf die Vorbehandlung des Normalserums und zwar in

Ia = N = frisch sofort nach Blutabnahme verarbeitet

Ib = N = 48 Std. Aufbewahrung bei -20°C , 2mal tgl. aufgetaut

Ic = N = 14 Tage Aufbewahrung bei -20°C , 1mal tgl. aufgetaut

Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen der Versuchsreihe I beziehen sich auf die primäre Reaktion von Normalserum mit Rheumatikerserum vor Zugabe zur Latexsuspension. M a t h i e s ¹⁰ konnte zeigen, daß zumindest der hitzelabile Inhibitor außer mit beladenen Latexpartikeln auch mit Rheumafaktor reagiert, für den sog. hitzestabilen Inhibitor ist die Reaktion mit Rheumafaktor ebenfalls als sicher anzusehen.

Die Ergebnisse des Versuches Ia finden sich in Tabelle 1 und sind in Abbildung 1 übersichtlich graphisch dargestellt. Die Resultate bestätigen die Untersuchungen von M a t h i e s ¹⁰ und zeigen eine deutliche Inhibition durch frisch verarbeitetes natives Normalserum. Bei inaktiviertem Serum ist die inhibitorische Aktivität deutlich geringer. Wenn man den hitzelabilen Inhibitor durch Bindung an Rheumafaktor stabilisiert und das Gemisch von N + R nach Inkubation inaktiviert, nimmt die inhibitorische Aktivität des Serums gegenüber dem Effekt des hitzelabilen Inhibitors noch weiter zu, und zwar etwa um den Betrag, den die Aktivität des hitzestabilen Inhibitors allein ausmacht. Durch dieses Ergebnis wird unterstrichen, daß der sog. hitzestabile Inhibitor erst durch die Seruminaktivierung entsteht, da sonst die inhibitorische Aktivität des nativen Serums nicht durch Inaktivierung des Gemisches von N + R nach gegenseitiger Reaktion noch gesteigert werden könnte.

In Versuch Ib, dessen Ergebnisse in Tabelle 1 und Abbildung 2 dargestellt sind, wurde das verwendete Normalserum vor der Verwendung im Versuchsansatz 48 Stunden bei -20°C aufbewahrt und zwischenzeitlich täglich zweimal, insgesamt also viermal auf Zimmertemperatur aufgetaut. Dabei fällt eine stärkere inhibitorische Aktivität des nativen Normalserums gegenüber dem gleichen Serum in frischem Zustand auf. Besonders auffällig ist aber, daß nach Inaktivierung des Normalserums der "hitzestabile Inhibitor" stark an Aktivität zugenommen hat. Dagegen ist der Zuwachs von Inhibitionsaktivität nach Inaktivierung des Gemisches von N + R in diesem Versuch auffallend gering.

Versuchs- reihe	anordnung	% optische Dichte bei einer Rheumatiker Serum-Verdünnung von									
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
Ia	1	8,4	7,6	6,3	7,6	18,1	45,6	81,0	93,6	97,5	
	2	28,7	26,2	26,2	36,3	60,0	87,8	95,4	94,6	101,2	
	3	38,2	33,3	36,1	55,6	78,3	90,4	96,2	99,0	98,7	
	4	20,2	17,7	16,9	21,5	28,3	46,3	75,6	93,7	99,2	
Ib	1	22,6	21,1	23,4	34,2	54,0	70,4	87,2	98,0	98,6	
	2	61,2	57,6	59,6	74,6	88,2	90,6	98,1	98,4	102,0	
	3	67,8	63,6	67,4	80,6	87,7	92,4	99,6	98,0	101,8	
	4	42,3	41,1	50,4	50,4	63,5	81,0	93,7	94,7	99,1	
Ic	1	18,1	17,2	21,6	36,2	57,0	85,7	95,7	103,0	100,0	
	2	76,7	69,3	71,7	85,2	91,7	95,8	99,0	99,7	99,0	
	3	67,2	63,2	73,0	85,4	92,3	95,0	99,3	99,0	99,6	
	4	59,2	54,0	54,6	59,6	71,2	87,7	94,7	95,8	97,3	

T a b e l l e 1

Ergebnisse der Versuchsreihe I in % der optischen Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Versuchsanordnungen siehe Text.

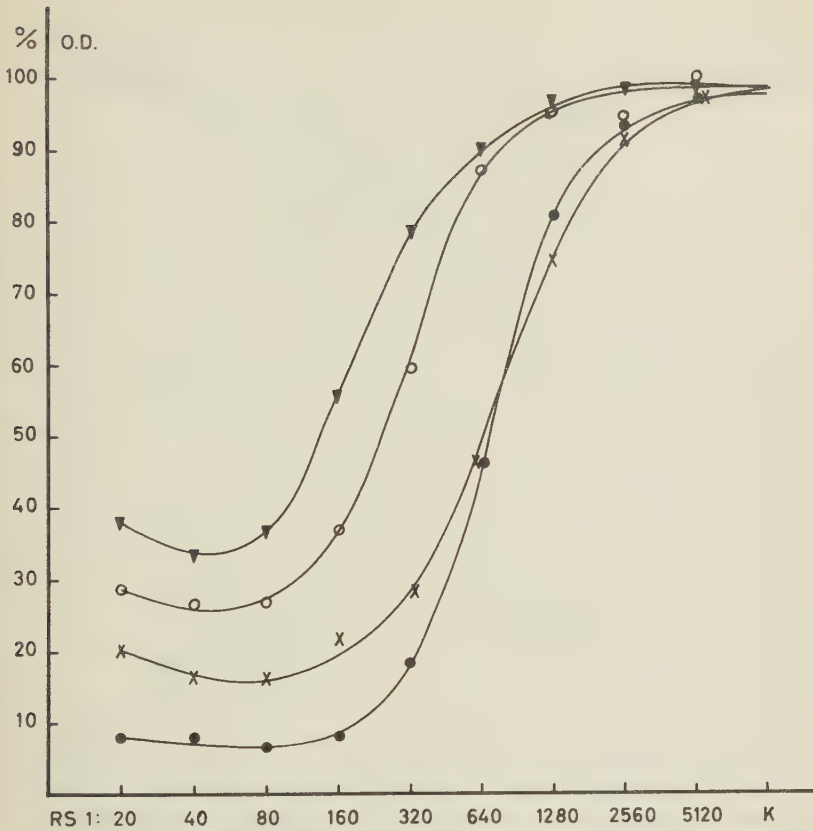


Abbildung 1

- = Versuch Ia 1
- = Versuch Ia 2
- ▼ = Versuch Ia 3
- × = Versuch Ia 4

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe Ia. Optische Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Beschreibung der einzelnen Versuche siehe im Text.

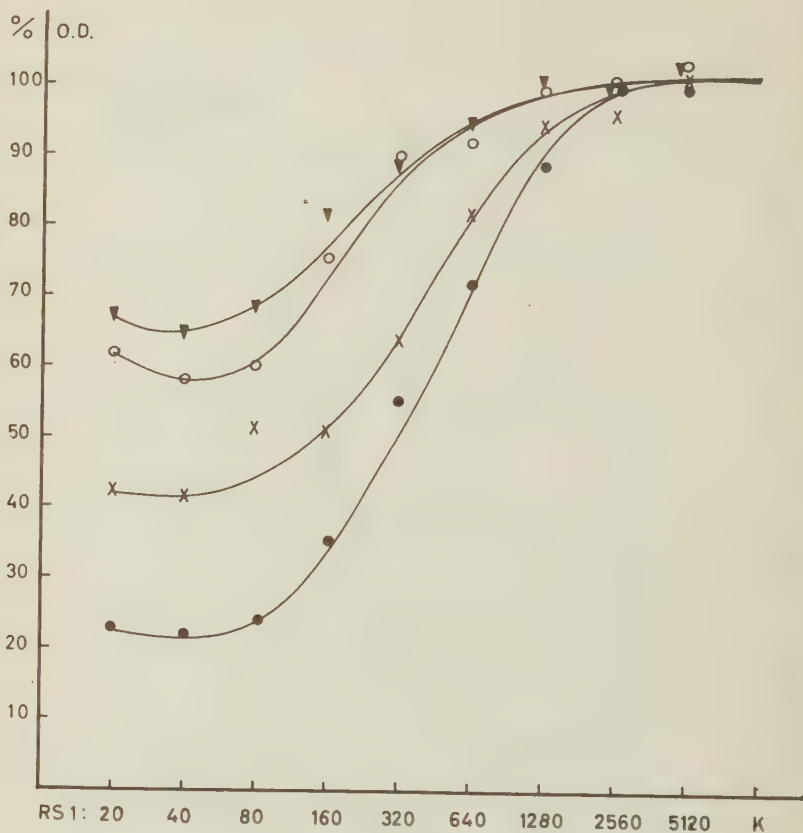


Abbildung 2

- = Versuch Ib 1
- = Versuch Ib 2
- ▼ = Versuch Ib 3
- × = Versuch Ib 4

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe Ib. Optische Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Beschreibung der einzelnen Versuche siehe im Text.

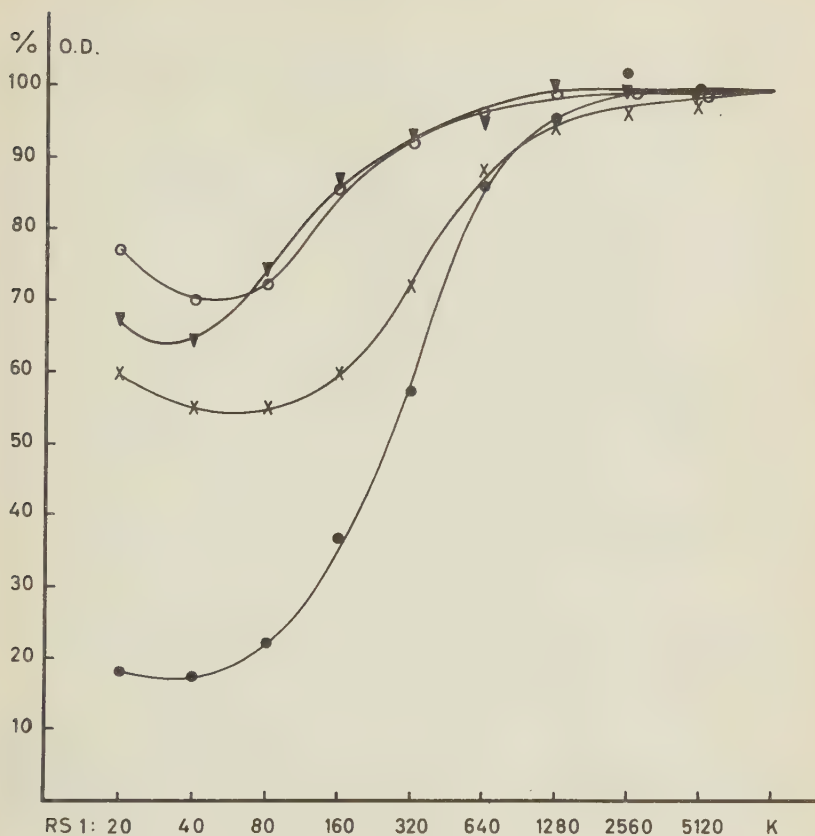


Abbildung 3

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe Ic. Optische Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Beschreibung der einzelnen Versuche siehe im Text.

- = Versuch Ic 1
- = Versuch Ic 2
- ▼ = Versuch Ic 3
- x = Versuch Ic 4

Noch deutlicher kommt diese Tendenz im Versuch Ic zum Ausdruck, in dem das Normalserum 14 Tage bei -20°C unter täglich einmaligem Wiederauftauen vor dem Versuchsansatz vorbereitet wurde (Tabelle 1, Abbildung 3). Hier ist die Aktivität des "hitzeinstabilen Inhibitors", also bei Verwendung des inaktivierten Serums, noch wesentlich stärker, dagegen ist bei Inaktivierung des Gemisches von N + R kein Zuwachs von inhibitorischer Aktivität mehr festzustellen. Eher liegt die betreffende Kurve in ihrem Ansatz etwas niedriger, was aber wohl nicht als verwertbarer Effekt zu deuten ist.

Diese Versuchsergebnisse besagen, daß durch Aufbewahrung bei -20°C und wiederholtem Auftauen der Aggregatzustand der γ -Globuline verstärkt zu werden scheint. Das kommt darin zum Ausdruck, daß bei Inaktivierung des durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen präparierten Normalserums der Aggregatzustand noch weiter verstärkt zu werden scheint und dadurch eine stärkere Inhibition gegenüber unvorbereitetem Serum sichtbar wird. Andererseits nimmt die zusätzliche inhibitorische Aktivität schließlich nicht mehr zu, wenn man das Gemisch des durch Einfrieren und Auftauen präparierten Serums mit Rheumafaktor nach Inkubation inaktiviert. Das besagt, daß in diesem Fall die inhibitorische Aktivität des nativen Serums bereits vorwiegend durch γ -Globulin-Aggregate bedingt ist, so daß eine zusätzliche Aggregation durch Erhitzen praktisch nicht mehr ins Gewicht fällt. Dennoch muß hitzelabiler Inhibitor noch zu einem gewissen Anteil vorhanden sein, da die Inhibition des inaktivierten, durch Einfrieren und Auftauen präparierten, Serums nicht ganz das Ausmaß erreicht, wie es bei Inaktivierung des Gemisches von präpariertem Normalserum mit Rheumatiker Serum der Fall ist. Es gelang also durch das von C h r i s t i a n ² beschriebene wiederholte Einfrieren und Wiederauftauen des Serums nicht, den hitzelabilen Inhibitor gänzlich zu inaktivieren. Vor allem bilden sich auch hierbei γ -Globulin-Aggregate, die ihrerseits eine inhibitorische Wirkung ausüben. Daher ist bisher keine Möglichkeit gefunden worden, den hitzelabilen Inhibitor zu inaktivieren, ohne gleichzeitig den hitzeinstabilen Inhibitor zu aktivieren.

Versuchsreihe II

Deicher³ beschrieb bereits, daß die Aggregationsfähigkeit der γ -Globuline individuell unterschiedlich sein kann. Es sollten deshalb im Vergleich zur Versuchsreihe Ia, in der das Normalserum des Probanden eine deutliche Inhibitionsaktivität seines hitzestabilen Inhibitors zeigte, ein Beispiel für ein Normalserum gegeben werden, dessen hitzelabiler Inhibitor eine etwas geringere Aktivität zeigt. Es sollte versucht werden, die Aktivität des hitzestabilen Inhibitors durch stärkere Erhitzung (für 5 min auf 63°C) durch stärkere Aggregation weiter zu steigern.

Versuchsanordnung

- 1) (R + L) 60' 56° (Standardagglutination)
- 2) [(N 30' 56° + L) 45' 37° + R] 60' 56°
- 3) [(N 30' 56°
5' 63° + L) 45' 37° + R 60' 56°
- 4) [(N nativ + L) 45' 37° + R 60' 56°

Besprechung der Ergebnisse

Die in Tabelle 2 angegebenen und in Abbildung 4 graphisch dargestellten Werte zeigen die relativ schwache Inhibition des hitzestabilen Inhibitors, besonders bei stärkeren Referenzserumkonzentrationen. Erhitzt man das inaktivierte Normalserum kurzfristig (5 min) auf 63°C, so wird die inhibitorische Aktivität wesentlich gesteigert und übersteigt sogar die des hitzelabilen Inhibitors nicht unwesentlich. Auch dieser Versuch zeigt, daß der Aggregatzustand des 7S- γ -Globulins eine wesentliche Rolle bei der Aktivität des sogenannten hitzestabilen Inhibitors spielt.

Versuchs- reihe	anordnung	% optische Dichte bei einer Rheumatikenserum-Verdünnung von									
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
II	1	25,1	22,3	22,3	23,4	32,4	45,8	72,7	89,9	100,0	
	2	29,5	25,0	28,6	44,5	70,0	85,0	99,0	100,0	100,0	
	3	57,6	52,8	52,8	57,6	67,2	81,7	93,2	96,1	96,1	
	4	50,3	42,9	42,9	54,6	73,2	87,0	97,6	98,0	97,6	

T a b e l l e 2

Ergebnisse der Versuchsreihe II in % der optischen Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Versuchsanordnungen siehe Text.

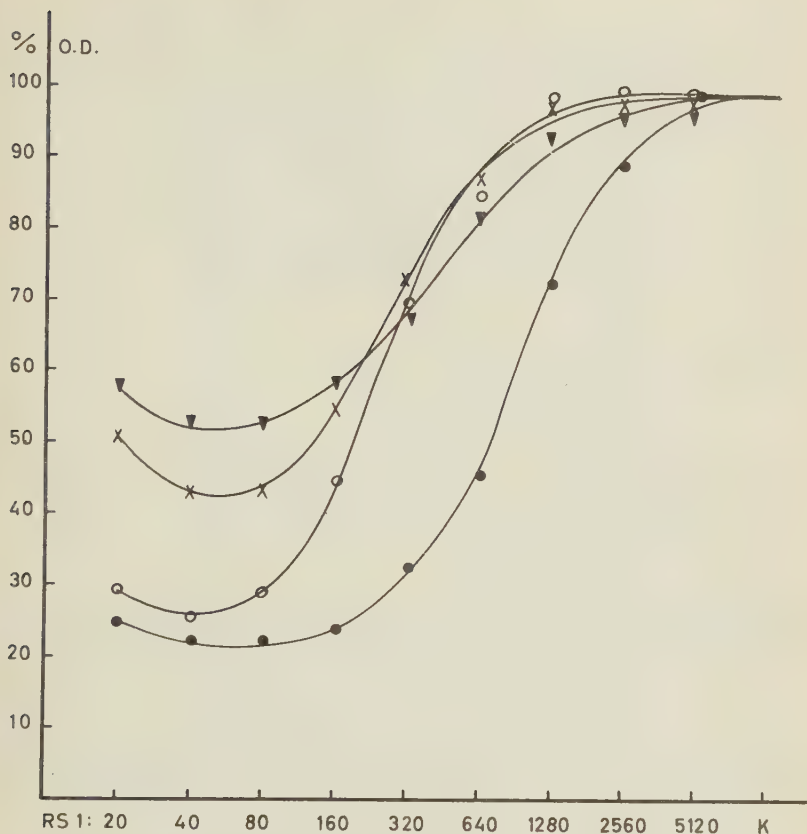


Abbildung 4

- = Versuch II 1
- = Versuch II 2
- ▼ = Versuch II 3
- × = Versuch II 4

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II. Optische Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Beschreibung der einzelnen Versuche siehe im Text.

Versuchsreihe III

Nachdem sich gezeigt hatte, daß durch kurzfristige Erhitzung auf höhere Temperaturen eine Verstärkung der Inhibition des "hitzestabilen Inhibitors" gegenüber der Inaktivierungstemperatur von 56°C erreicht wird, sollte noch untersucht werden, ob durch längere Einwirkung der Inaktivierungstemperatur von 56°C eine Verstärkung der Aggregation der γ -Globuline erreicht wird. Es wurde deshalb das Serum statt der üblichen Zeit von 30 Minuten 60 Minuten inaktiviert.

Versuchsanordnung

- 1) (R + L) 60' 56°
- 2) [(N 30' 56° + L) 45' 37° + R] 60' 56°
- 3) [(N 60' 56° + L) 45' 37° + R] 60' 56°

Besprechung der Ergebnisse

Eine längere Inaktivierungszeit erhöht die inhibitorische Aktivität des "hitzestabilen Inhibitors" nicht, wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist. Der Kurvenverlauf (Abbildung 5) liegt sogar im Ganzen etwas tiefer, was darauf hindeuten könnte, daß der hitzestabile Inhibitor innerhalb von 30 Minuten nicht vollständig inaktiviert wurde. Da die Differenz jedoch nicht erheblich ist, möchten wir dieser Feststellung vorläufig keine Bedeutung beimessen. Es kann lediglich die Anregung gegeben werden, dieser Frage näher nachzugehen. Die Versuche dieser Reihe zeigen zumindest, daß eine Verlängerung der Inaktivierungszeit keinen Einfluß auf den Aggregationsgrad der γ -Globuline ausübt.

Versuchs- reihe	anordnung	% optische Dichte bei einer Rheumatikserum-Verdünnung von							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
III	1	25,1	22,3	22,3	23,4	32,4	45,8	72,7	89,9
	2	29,5	25,0	28,6	44,5	70,0	85,0	99,0	100,0
	3	27,1	24,8	39,8	40,7	59,7	80,5	94,1	96,3

T a b e l l e 3

Ergebnisse der Versuchsreihe III in % der optischen Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Versuchsanordnungen siehe Text.

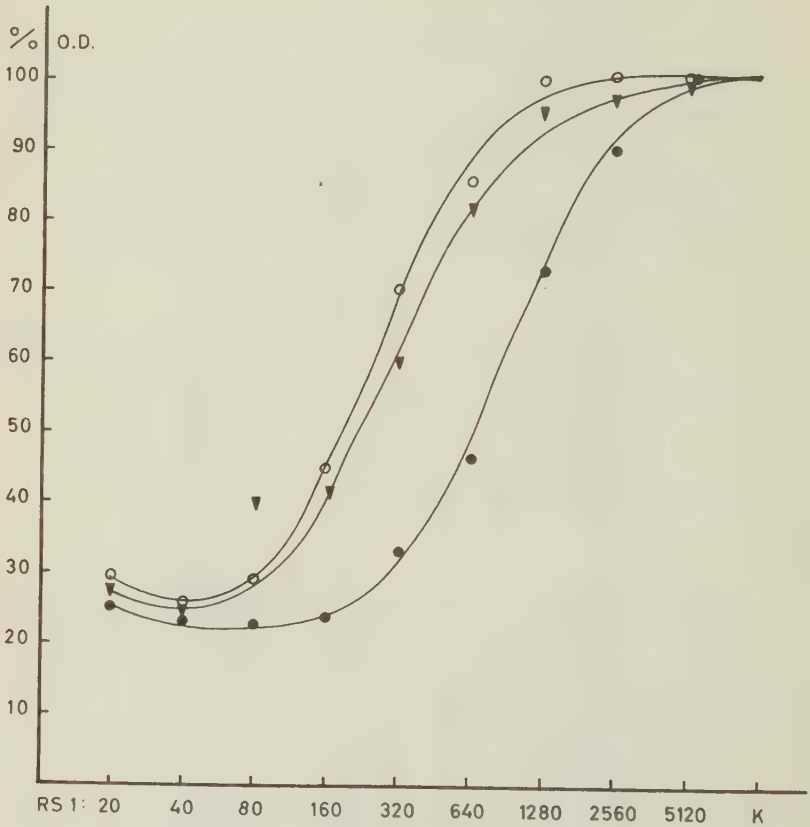


Abbildung 5

- = Versuch III 1
- = Versuch III 2
- ▼ = Versuch III 3

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe III. Optische Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latexpartikel. Beschreibung der einzelnen Versuche siehe im Text

Diskussion

Die Untersuchungen bestätigen die bisherige Annahme, daß es sich bei dem sogenannten "hitzestabilen Inhibitor" um aggregiertes γ -Globulin handelt und daß der Aggregationszustand eine wesentliche Rolle für die inhibitorische Potenz spielt. Die inhibitorische Wirkung des "hitzestabilen" Inhibitors ist so zu verstehen, daß Rheumafaktor mit den γ -Globulin-Aggregaten reagiert und so von der Reaktion mit den beladenen Latexpartikeln abstrahiert wird. Dadurch wird die Agglutinationswirkung des Rheumafaktors entsprechend vermindert. Prinzipiell handelt es sich also bei der Reaktion von Rheumafaktor einerseits und "hitzestabilem" Inhibitor bzw. mit γ -Globulin beladenen Latexpartikeln um den gleichen Vorgang, nämlich die Anlagerung von γ -Globulin-Aggregaten an Rheumafaktor. Im Falle der beladenen Latexpartikel, wobei die γ -Globulin-Moleküle auf der Latex-Oberfläche im Aggregatzustand vorliegen, ist die Reaktion durch die auftretende Agglutination sichtbar, während die Präzipitation mit freien γ -Globulin-Aggregaten natürlich unsichtbar bleibt.

Es war bereits bekannt (M a t h i e s ¹⁰), daß eine Seruminaktivierung für 30 min auf 56°C genügt, um eine zur Inhibition ausreichende Aggregatbildung zu erzielen. Gleichzeitig wird der hitzelabile Inhibitor inaktiviert. Die Aggregatbildung der γ -Globulin-Moleküle und damit die Potenz des hitzestabilen Inhibitors kann durch verschiedene Vorgänge deutlich gesteigert werden. So ist das z.B. der Fall, wenn die Seren bei -20°C im Kühlschrank für längere Zeit aufbewahrt und zwischenzeitlich mehrfach wieder aufgetaut werden. Die Versuchsergebnisse, die zu dieser Feststellung führten, wurden oben (Besprechung der Ergebnisse der Versuchsreihe I) ausführlich diskutiert.

Auch die kurzfristige (5 min) Erhitzung der Seren auf 63°C nach vorheriger Inaktivierung (30 min bei 56°C) verstärkt deutlich die Aktivität des "hitzestabilen Inhibitors" durch

Zunahme der Aggregatbildung der γ -Globulin-Moleküle (Versuchsreihe II).

Dagegen hat eine Verlängerung der Inaktivierungszeit 60 Minuten (statt 30 min bei 56°C) keinen Einfluß auf den Aggregationsgrad der γ -Globulin-Moleküle, wie die Untersuchungen der Versuchsreihe III gezeigt haben. Damit wird durch die übliche Seruminaktivierung ein Aggregationszustand der γ -Globuline erreicht, der nicht durch eine Zeitverlängerung, wohl aber durch eine Temperaturerhöhung verstärkt werden kann.

Diese Untersuchungen unterstreichen die bisherige Annahme von Mathies¹⁰, Christian² sowie Franklin und Mitarbeitern⁶, daß der hitzestabile Inhibitor aggregiertes γ -Globulin darstellt, und daß die Aggregate im Ziff'schen Inhibitionstest¹⁶ durch die Seruminaktivierung entsteht. Eine für praktische Zwecke einfache Methode zur Verstärkung des "hitzestabilen" Inhibitors durch bessere Aggregatbildung stellt die kurzfristige Erhitzung auf 63°C dar.

Zusammenfassung

Es wurden Versuchsergebnisse ausgewertet, die die Bedeutung des Aggregationszustandes der 7S-y-Globuline für die inhibitorische Potenz des sogenannten hitzestabilen Inhibitors im Agglutinationssystem mit Rheumatiker Serum aufzeigen. So wird die Inhibitionsaktivität durch Zunahme des Aggregationszustandes deutlich verstärkt, wenn man Seren über längere Zeit unter wiederholtem zwischenzeitlichen Auftauen auf -20°C einfriert. Auch eine kurzfristige Erhitzung der Seren für 5 min auf 63°C erhöht die inhibitorische Aktivität wesentlich. Es genügt jedoch die übliche Seruminaktivierung für 30 min bei 56°C , um durch Aggregatbildung den "hitzestabilen Inhibitor" zu aktivieren. Die hierbei erreichte inhibitorische Potenz wird durch Verlängerung der Temperatureinwirkung nicht gesteigert, wohl aber durch Erhöhung der Temperatur.

Literaturverzeichnis

- 1) Bernhard, G. C., Cheng, W. and Talmage, D. W.: The Reaction of Rheumatoid Factor and Complement with γ -Globulin coated Latex. J. Immunol. 88, 750 (1962)
- 2) Christian, C. L.: Characterisation of the "reactant" (gamma globulin factor) in the F II precipitin reaction and the F II tanned sheep cell agglutination test. J. exp. Med. 108, 139 (1958)
- 3) Deicher, H.: Mechanismus und Anwendung des Latex-Hemmungstests zur Diagnostik der primär-chronischen Polyarthrititis. I. Mitteilung. Klin. Wschr. 39, 612 (1961)
- 4) Edelmann, G. M., Kunkel, H. G. and Franklin, E. C.: Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gammaglobulin. J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 5) Epstein, W., Johnson, A. and Ragan, C.: Observations on a precipitin reaction between serum of patients with rheumatoid arthritis and a preparation (Cohn fraction II) of human gamma globulin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 235 (1956)
- 6) Franklin, E. C., Holman, H. R., Müller-Eberhard, H. J. and Kunkel, H. G.: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. J. exp. Med. 105, 425 (1957)
- 7) Hall, A. P., Mednis, A. D. and Bayles, T. B.: Latex agglutination and inhibition reactions; clinical experience in diagnosis of rheumatoid arthritis. New England J. Med. 258, 731 (1958)
- 8) Heller, G., Jacobson, A. S., Kolodny, M. H. and Kammerer, W. H.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis, II. The influence of human plasma fraction II (gamma globulin) on the reaction. J. Immunol. 72, 66 (1954)
- 9) Kleine, N., Müller, W. u. Matthes, M.: Ein neues Verfahren zum Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und Gammaglobulin. Z. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
- 10) Mathies, H.: Untersuchungen zur Natur und Reaktionsweise des Rheumafaktors und der Inhibitoren. Habilitationsschrift 1964. Dort weitere Literaturangaben.
- 11) Mathies, H. u. Fladerer, M.: Ergebnisse mit einer Modifikation des Inhibitionstestes in Verbindung mit dem Latextropfentest zur serologischen Rheumadiagnostik. Dtsch. med. Wschr. 88, 2391 (1963)

- 12) Miehle, K. u. Puttnins, T.: Der serologische Nachweis des Rheumafaktors durch den Inhibitionstest. Z. Rheumaforsch. 18, 372 (1959)
- 13) Müller, W. u. Haftstein, P.: Die quantitative Erfassung des "Rheumafaktors" durch Präzipitation des Serums mit Gamma-globulin im "Grenzschichtreaktiometer". Zschr. klin. Med. 156, 154 (1959)
- 14) Rantz, L. A., Randall, E. and Kettner, D.: Electrophoretical study of serum factors responsible for serological reaction in rheumatoid arthritis with demonstration of two inhibitors. Arthritis Rheumatism 2, 104 (1959).
- 15) Schierz, G.: Zur serologischen Diagnose der primär chronischen Polyarthrititis mit dem Hämagglutinations-Inhibitions-test. Z. Rheumaforsch. 21, 162 (1962)
- 16) Ziff, M., Brown, P., LoSpalluto, J., Badin, J. and McEwen, C.: Agglutination and inhibition by serum globulin in the sensitized sheep cell agglutination reaction in rheumatoid arthritis. Am. J. Med. 20, 500 (1956)

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Mathies danke ich für seinen Rat bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Lebenslauf

Am 25.12.1927 wurde ich als Sohn des Metzgermeisters Karl Fahr und seiner Ehefrau Maria Luise, geb. Graf, in Singen /Htwl. Baden geboren. Nach Absolvierung der Volksschule in Gottmadingen besuchte ich die Oberrealschule in Singen /Htwl. 1943 wurde ich zum Wehrdienst eingezogen. Nach meiner Gefangenschaft bestand ich im Juli 1948 das Abitur an der Oberrealschule in Singen /Htwl.

Im Wintersemester 1950/51 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Heidelberg. Zum Wintersemester 1953/54 wechselte ich an die Universität München und unterbrach mein Medizinstudium aus wirtschaftlichen Gründen bis 1959. Am 6. August 1959 heiratete ich Fräulein Paula Holzhäuer aus Elsenthal /Ndb.

Im Februar 1960 bestand ich mein Physikum und am 18. Dezember 1963 mein Medizinisches Staatsexamen an der Universität München.

Seit dem 1.1.1964 arbeite ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Poliklinik der Universität München.

